



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer : **0 541 507 A2**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑳ Anmeldenummer : **92890232.9**

⑤① Int. Cl.⁵ : **C12N 9/74, A61K 37/547**

㉔ Anmeldetag : **02.11.92**

③① Priorität : **04.11.91 AT 2183/91**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung :
12.05.93 Patentblatt 93/19

⑧④ Benannte Vertragsstaaten :
AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI NL SE

⑦① Anmelder : **IMMUNO Aktiengesellschaft**
Industriestrasse 67
A-1221 Wien (AT)

⑦② Erfinder : **Eibl, Johann, Dr.**
Gustav Tschermakgasse 2
A-1180 Wien (AT)
Erfinder : **Linnau, Yendra, Dr.**
Lavendelweg 24
A-1224 Wien (AT)

⑦④ Vertreter : **Wolfram, Gustav, Dipl.-Ing. et al**
Patentanwälte Sonn, Pawloy, Weininger &
Wolfram, Riemergasse 14
A-1010 Wien (AT)

⑤④ **Thrombin sowie Verfahren zu seiner Herstellung.**

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Thrombin menschlichen oder tierischen Ursprungs, welches frei ist von infektiösen Agentien und durch Aktivierung von Prothrombin, welches einer Hitzebehandlung zur Inaktivierung infektiöser Agentien unterworfen ist, hergestellt werden kann.

EP 0 541 507 A2

Die Erfindung betrifft ein Thrombin menschlichen oder tierischen Ursprungs sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung und dessen Verwendung.

Die Blutgerinnung durchläuft eine Serie von aufeinanderfolgenden Reaktionen, in denen Blutgerinnungsfaktoren aktiviert werden und letztlich Fibrin durch die Wirkung von aktiviertem Prothrombin (Thrombin) auf Fibrinogen gebildet wird. Die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin verläuft mit Faktor Xa und Calcium allein sehr langsam. Sie verläuft erst dann optimal, wenn wiederum ein Komplex mehrerer Faktoren (Prothrombinase-Komplex) vorliegt. Neben Faktor Xa gehören zu diesem Komplex Faktor V, Phospholipide und Calcium. Der Faktor Xa spaltet das Prothrombinmolekül (Molekulargewicht 68 kD) proteolytisch und generiert somit das aktive Enzym Thrombin (Molekulargewicht 30 kD).

Die Plasmaprotease Thrombin ist ein multifunktionelles Enzym, welches nicht nur durch Spaltung des Fibrinogens zu Fibrin koagulierend wirkt, sondern auch die Gerinnungsfaktoren V, VIII und XIII aktiviert und sein eigenes Proenzym (Prothrombin) spaltet.

In der Therapie wird Thrombin allein oder gemeinsam mit Fibrinogen zur Stillung von Blutungen oder in der Chirurgie zur Gewebeklebung eingesetzt.

Die Aktivierung von Prothrombin via dem Prothrombinasekomplex ist ex situ schwer nachzuahmen, weshalb es nicht an Versuchen fehlt, Thrombin durch die Einwirkung von Proteasen menschlichen oder tierischen Ursprungs zu generieren. Dabei ist zu bedenken, daß jeder Kontakt des Produktes mit menschlichem oder tierischem Material wegen der Kontaminationsgefahr mit infektiösen Agentien zu vermeiden ist.

Versuche zur Behandlung eines Prothrombin-komplexes, isoliert aus Plasma, mit Calciumionen sowie mit Calciumionen und einer Suspension enthaltend bovines Thromboplastin zeigten, daß die Behandlung mit Calciumionen alleine zu einer wesentlich geringeren Ausbeute und Reinheit des gebildeten Thrombins führt als die Behandlung mit Calciumionen und Thromboplastin (Cryobiology 21, 661-663 (1984)).

Aus der DE-A - 38 43 126 ist bekannt, daß aus Plasma, welches an eine Matrix adsorbiert und mit einem Prothrombinaktivator behandelt ist, Thrombin gewonnen werden kann. Als Aktivator werden beispielsweise Calciumionen, Calciumionen und Thromboplastin oder Faktor Xa genannt. Während der Aktivierung sind sämtliche biologische Cofaktoren, welche ebenfalls an der Matrix gebunden werden, anwesend.

Bei der Verwendung von plasmatischem Prothrombin zur Gewinnung von Thrombin besteht die Gefahr einer Kontamination mit infektiösen Agentien (z.B. Hepatitis-Viren; HIV). Dazu kommt noch, daß bei allen bekannten Aktivierungsverfahren neben

Calcium²⁺-Ionen die zusätzliche Verwendung biologischer Co-Faktoren empfohlen wird, womit eine weitere Kontaminationsquelle gegeben ist.

Nun ist zwar bekannt, daß infektiöse Agentien in biologischen Präparaten zuverlässig durch eine Hitzebehandlung, insbesondere in Kombination mit einer Dampfbehandlung, inaktiviert werden können (AT-B - 385.657). Es hat sich aber gezeigt, daß Thrombin aufgrund seiner Hitzelabilität in Gegenwart von Stabilisatoren erhitzt werden muß (DE-A - 38 09 991), um die Aktivität des Thrombins nicht zu beeinträchtigen. Die Verwendung von Stabilisatoren ist jedoch umstritten, da während der Hitzebehandlung nicht nur die Thrombinaktivität geschützt wird, sondern auch Viren stabilisiert werden.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, ein virussicheres Thrombin zur Verfügung zu stellen.

Das erfindungsgemäße virussichere Thrombin ist erhältlich aus einer virusinaktivierten Prothrombin-haltigen Plasmafraktion durch ausschließliche Aktivierung mit gerinnungsaktiven Salzen, beispielsweise mit Calcium-, Strontium- oder Zinkionen. Derartige Salze fördern die Bildung von Thrombin aus den entsprechenden Gerinnungsfaktoren.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß infektiöse Agentien, welche in plasmatischem Prothrombin vorhanden sind, durch eine Behandlung des Prothrombins zur Virusinaktivierung unschädlich gemacht werden können, ohne die biologische Aktivität des aus dem Prothrombin erhältlichen Thrombins wesentlich zu beeinträchtigen.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die Aktivierung einer virusinaktivierten Prothrombin-haltigen Fraktion allein durch Zugabe von gerinnungsaktiven Salzen in einfacher Weise zu einer hohen Ausbeute bzw. Reinheit des Produktes führt, ohne weitere Zugabe von biologischen Co-Faktoren, wie die Gerinnungsfaktoren V, Xa oder Phospholipide. Eine Kontamination während der Aktivierung wird also vermieden, weshalb auch das generierte Thrombin, gleich dem Ausgangsmaterial, als virussicher gilt.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, das virussichere Thrombin aus virusinaktiviertem Prothrombin-komplex, insbesondere aus virusinaktiviertem aktiviertem Prothrombinkomplex, zu generieren. Die Aktivierung von aktiviertem Prothrombinkomplex durch Zusatz von gerinnungsaktiven Salzen erfolgt mit überraschend hoher Reaktionsgeschwindigkeit. Die Ausbeute an Thrombin wird gleichfalls optimiert.

Besonders vorteilhaft ist die Herstellung des virussicheren Thrombins aus FEIBA. Ein aktivierter Prothrombinkomplex bzw. FEIBA kann durch bereits bekannte Maßnahmen (AT-B - 350.726, AT-B - 368.883, EP-B - 0 041 173) aus einem Prothrombin-komplex hergestellt werden.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines virussicheren Thrombins und ist gekennzeichnet durch die Kombination der Maßnah-

men, daß

- ein aktivierter Prothrombinkomplex aus einer prothrombinhaltigen Plasmafraktion hergestellt wird,
- der aktivierte Prothrombinkomplex zur Inaktivierung infektiöser Agentien behandelt wird, und
- gerinnungsaktive Salze zum behandelten aktivierten Prothrombinkomplex zugesetzt werden, um Thrombin zu generieren.

Thrombin wird vorteilhafterweise durch Ionenaustauscherchromatographie und/oder Affinitätschromatographie weiter gereinigt.

Ein virussicheres Thrombin gemäß der obigen Beschreibung eignet sich besonders zur Verwendung von pharmazeutischen Präparationen und zur Herstellung von Diagnostika.

Mit den nachfolgenden Beispielen wird die Erfindung noch näher erläutert, wobei die Beispiele 3 und 4 die weitere Reinigung des nach Beispiel 1 hergestellten Thrombins betreffen.

Beispiel 1:

Aus 15 l menschlichem kryopräzipitat-armen Blutplasma wurden Prothrombin (Faktor II) neben den Gerinnungsfaktoren VII, IX und X an einem Anionenaustauscher (DEAE-Sephadex) gebunden. Nach der Elution der Faktor II-enthaltenden Fraktion mittels 0,5-molarer NaCl-Lösung wurde bei dieser Lösung die Salzkonzentration auf 0,15 Mol/l durch Diafiltration verringert und anschließend gefriergetrocknet.

Um eventuell enthaltene Krankheitserreger zu inaktivieren, wurde diese Fraktion nach der AT-B - 385.657 10 h bei 60°C und 1 h bei 80°C erhitzt. Die Prothrombinaktivität betrug 5.250 E. Das Prothrombin wurde in einer Lösung zu 2,5 E/ml gelöst und mit 2,5 mMol/l CaCl_2 bei +30°C bei einem pH-Wert von 7,0 langsam gerührt; nach 80 min wurde die Thrombinaktivität (mittels chromogenem Substrat Th-1 (Fa. Immuno)) mit 48 E pro 1 E Faktor II bestimmt.

Durch Abkühlung auf +4°C und durch Zusatz von Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) wurde die Thrombin-Generierung gestoppt. Mittels Ultrafiltration/Diafiltration mit einer Ultrafiltrationsmembran (Porengröße: 10.000) wurde der Ca-Komplex entfernt. Anschließend wurde das Konzentrat zu einer pharmazeutischen Präparation fertiggestellt.

Beispiel 2:

20 ml einer FEIBA-hältigen Lösung (IMMUNO AG, Wien) mit einer FEIB-Aktivität von 966 Einheiten und 992 Einheiten Faktor II wurde mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung auf 330 ml verdünnt und mit 2,75 mMol/l CaCl_2 bei +30°C langsam gerührt. Nach 90 min erreichte die Thrombinaktivität ein Maximum von 51 Einheiten pro Einheit Faktor II. Die Aktivierung wurde

durch Abkühlung der Lösung auf +4°C und Zusatz von Natriumcitrat gestoppt.

Beispiel 3:

20.000 E Thrombin, nach Beispiel 1 hergestellt, wurden an einer Säule von 20 ml S-Sepharose bei einer Leitfähigkeit von 10,5 mS/cm bei einem pH-Wert von 6,0 adsorbiert. Anschließend wurde mit 140 ml einer 150-mMolaren NaCl-Lösung gewaschen, um die nicht gebundenen Proteine zu entfernen.

Die Thrombin-hältige Fraktion wurde mit 100 ml einer 750-mMolaren NaCl-Lösung eluiert, aufkonzentriert, diafiltriert und schließlich zu einer pharmazeutischen Präparation fertiggestellt.

Die Ausbeute an Thrombinaktivität war mehr als 90 %.

Beispiel 4:

10.000 E Thrombin, nach Beispiel 1 hergestellt, wurden an einer Säule von 10 ml Lysin-Sepharose, äquilibriert mit einer 150 mMol Natriumacetatlösung, pH 6,7, aufgetragen. Die beladene Säule wurde mit dem gleichen Puffer gewaschen und die thrombinhaltige Fraktion wurde mit einer 300 mMolaren Lysin-Lösung eluiert; die Thrombinaktivität war 9400 E und die spezifische Aktivität 1850 E/mg Protein.

Patentansprüche

1. Virussicheres Thrombin menschlichen oder tierischen Ursprungs, erhältlich aus einer virusinaktivierten Prothrombin-haltigen Plasmafraktion durch ausschließliche Aktivierung mit gerinnungsaktiven Salzen.
2. Thrombin nach Anspruch 1, erhältlich aus einer Plasmafraktion, die den Prothrombinkomplex enthält.
3. Thrombin nach Anspruch 1, erhältlich aus einer Plasmafraktion, die den aktivierten Prothrombinkomplex enthält.
4. Thrombin nach Anspruch 1 oder 2, erhältlich aus einer Plasmafraktion, enthaltend FEIBA.
5. Pharmazeutische Präparation enthaltend ein Thrombin nach den Ansprüchen 1 bis 4.
6. Verfahren zur Herstellung eines virussicheren Thrombins, gekennzeichnet durch die Kombination der Maßnahmen, daß
 - ein aktivierter Prothrombinkomplex aus einer prothrombinhaltigen Plasmafraktion hergestellt wird,

- der aktivierte Prothrombinkomplex zur Inaktivierung infektiöser Agentien behandelt wird, und
- gerinnungsaktive Salze zum behandelten aktivierten Prothrombinkomplex zugesetzt werden, um Thrombin zu generieren.

5

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Thrombin weiters durch Ionenaustauscherchromatographie und/oder Affinitätschromatographie gereinigt wird.

10

8. Verwendung von Thrombin nach den Ansprüchen 1 bis 4 zur Herstellung von pharmazeutischen Präparationen und zur Herstellung von Diagnostika.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

4